نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۲۴۰-۲۳۱

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 2, Summer 2020, p. 231-240

مقاله علمی- پژوهشی

بازسازی شبکه ژن‌های هم‌بیان مرتبط با رشد و تکامل فولیکول‌های الیاف در جنین بز کرکی

ارسلان برازنده[1]، مرتضی مختاری[1]، الهام بهدانی[2]، زهرا رودباری[1*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۰

چکیده

فولیکول مو قسمتی از پوست است که مو را تولید و چرخه رشد مو را کنترل می‌کند. فولیکول مو مرکزی برای رشد الیاف مهم از نظر اقتصادی در صنعت دامپروری است. مطالعات نشان داده‌اند که تغییرات در سطح بیان ژن ها در رشد و نمو فولیکول مو تاثیر دارد. با وجود پیشرفت های اخیر در شناسایی شبکه های هم بیانی ژن ها و سیگنال های مولکولی که بر توسعه پوست و رشد فولیکول مو حاکم است، مکانیسم های تنظیم کننده ساخت الیاف بز کرکی، هنوز شناسایی نشده است. از این‌رو، پژوهش کنونی برای بررسی مهمترین مولکول‌های کنترل کننده رشد و نمو فولیکول‌های الیاف در بز کرکی و رمزگشایی ژن های درگیر در رشد و نمو فولیکول‌های الیاف انجام شد. به این منظور، از داده‌های مربوط به توالی یابی رونوشت های پوست جنین بزهای کرکی شانبی در سه مرحله رشد استفاده شد. آنالیز بیان افتراقی رونوشت ها نشان داد که در تمام طول روند رشد فولیکول بیان ۱۴۵ ژن افزایش و بیان ۶۵۰ ژن کاهش داشته است. از بین ژن‌هایی با بیان افتراقی، ژن‌های تنظیمی هم بیان بر اساس نتایج واکاوی پارامترهای آماری شبکه و مستند سازی کارکردی شناسایی شدند که شامل: SHH، KLF4، MMP9، MSX1، KRT17، COL2A1 و VEGFA بودند. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش کنونی ژن هایی با اثرات عمده شناسایی شدند که تنظیم کننده شبکه‌های بیانی ژن ها و سیگنال‌های مولکولی مرتبط با ساخت الیاف بز کرکی هستند. این ژن ها با توجه به مستند سازی عملکردی می توانند نقش قابل توجهی در بهبود اصلاح نژاد بز کرکی ایفا کنند.

کلمات کلیدی: آنالیز رونوشت، الیاف بز کرکی، بیان افتراقی، شبکه تنظیمی بیان

مقدمه

بز یکی از منابع مهم تامین کننده گوشت، شیر، کرک و مو برای بشر است و بنابراین نقش کلیدی در عرصه اقتصادی، اجتماعی و فرهنگی بخصوص در کشورهای درحال توسعه ایفا می کند، زیرا ۹۵ درصد جمعیت بز دنیا در این کشورها پرورش می یابند(۲۳و ۲۷). بزهای کرکی از جمله مهمترین نژادهای بز در دنیا هستند که دارای دو پوشش کرک و مو می باشند. در ایران بزهای کرکی عمدتاً بومی مناطق خراسان جنوبی و کرمان هستند و بهترین نوع کشمیر را تولید می‌کنند (۲ و ۴). کرک و کلیه الیاف دامی به وسیله فولیکول‌های موجود در پوست به وجود می‌آیند. به طور کلی در پوست دو نوع فولیکول اولیه و ثانویه وجود دارد که از نظر بافت شناسی با یکدیگر متفاوتند. در بزهای کرکی الیاف مو توسط فولیکول‌های اولیه ساخته می‌شوند و الیاف کرک از فولیکول‌های ثانویه به وجود می‌آیند (۸ و ۳۲). عوامل متعددی بر نسبت این دو نوع فولیکول و فعالیت آنها نقش دارند. این عوامل به طور مستقیم می‌توانند بر میزان کرک تولیدی و کیفیت آن (طول و قطر الیاف) تأثیر گذارند. از جمله این عوامل می‌توان به سن دام، مدیریت تغذیه‌ای و ژنتیک آن اشاره داشت (۲).

در عرصه ژنتیک، پژوهش‌های مختلفی بر اساس ژنتیک کلاسیک و ژنتیک مولکولی انجام شده و ژن‌های مختلفی در رابطه با کیفیت و کمّیت کرک تولیدی گزارش شده است. یکی از ژن‌هایی که بر خصوصیات الیاف تولیدی در بز کرکی به کمک تکنیک PCR-SSCP مؤثر شناسایی شده است، ژن KAP8.1[3] می‌باشد (۱۷) که به عنوان یک ژن نشانگر احتمالی مرتبط با وزن کرک در بزهای کرکی معرفی شده است. در مطالعه دیگری ژن‌های KAP[4] به عنوان مهمترین کنترل کننده‌های خصوصیات الیاف تولیدی در دام معرفی شده است و از این ژن‌ها به عنوان مهمترین نشانگرهای مولکولی

۱-استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.
۲-دانش آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین ، خوزستان، ایران.
(*- ایمیل نویسنده مسئول: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v12i2.81710

3- Keratin-associated protein 8.1
4- Keratin-associated protein

احتمالی مرتبط با ظرافت الیاف یاد شده است (۳).

در کنار ژنتیک مولکولی و ژنتیک کلاسیک، داده‌های امیکس به همراه نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی ابزار جدیدی را برای شناسایی مولکول‌های تنظیم کننده در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی فرآهم آورده است. یک دسته مهم از داده های امیکس، داده‌های بیان ژن می‌باشند که با تحلیل این نوع داده‌ها می‌توان مهمترین سازوکارهای مولکولی و مولکول‌های تنظیم کننده در فرآیندهای فیزیولوژیکی را شناسایی کرد. در مطالعه ای در سال ۲۰۱۶ با بررسی ژن‌های متفاوت بیان شده در فولیکول‌های اولیه و ثانویه گزارش شد که ۶۱۷ ژن در دو نوع فولیکول ذکر شده به صورت متفاوتی بیان می‌شوند. این ژن‌ها به طور موثر در متابولیسم سیستئین و متیونین، پلیمریزاسیون مولکول RNA و مسیر سیگنالدهی MAPK در فولیکول اولیه نقش دارند. به کمک این مطالعه روند تکامل فولیکول‌های اولیه و تبدیل آنها به فولیکول‌های ثانویه بررسی شد (۲۲) در پژوهش دیگری نیز برای شناسایی سازوکارهای مولکولی مؤثر بر تکامل فولیکول‌های پوست، داده‌های بیان ژن از فولیکول‌های الیاف پوست در سه مرحله تکامل آناژن، کاتاژن و تلوژن بررسی شدند (۹). در مطالعه‌ای دیگر برای شناسایی مهمترین ژن‌های کنترل کننده تولید الیاف در گونه بز کرکی پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی با استفاده از داده‌های بیان ژن بررسی شدند (۳۱).

شبکه های ژنی یکی از مهمترین ابزارهای بیوانفورماتیکی در شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات و مسیرهای بیولوژیکی می‌باشند. در این شبکه‌ها به کمک الگوریتم‌های مختلفی روابط بین ژن‌ها بررسی می شود و به این ترتیب می‌توان ژن‌هایی که در بالا دست سایر ژن‌ها قرار دارند و بیان آنها را کنترل می‌کنند و یا تحت تأثیر قرار می‌دهند، را جستجو کرد. در این مطالعه با استفاده از شبکه‌های هم‌بیان و بررسی برهمکنش‌های پروتئینی سعی بر شناسایی مهمترین ژن‌های مؤثر بر روند تکامل فولیکول‌های الیاف در بز کرکی از دوران جنینی تا تولد، شده است.

مواد و روش‌ها

داده های مورد استفاده

داده های مربوط به توالی یابی رونوشت های پوست جنین بزهای کرکی با کد شناسایی SRP059481 از پایگاه داده NCBI در بخش SRA دانلود شدند. داده ها حاصل از آزمایش بر روی بز های کرکی شانبی بود. در این آزمایش تعداد ۹ بز در مرحله یکسان آبستنی انتخاب شده بودند و تعداد سه جنین در روز ۶۰ آبستنی (E60)، تعداد سه جنین در روز ۱۲۰ آبستنی(E120) از طریق سزارین بدست آمده و سه جنین نیز دو ساعت بعد از تولد (NB) کشته شده بودند. برای انجام آنالیزهای RNA-seq نمونه برداری از سمت راست پوست جنین‌ها و سه تکرار برای هر مرحله در نظر گرفته شده بود. توالی‌یابی با استفاده از ایلومینا HiSeq 2000 در شرکت ژن دنوو در شهر گوانگ جو در کشور چین انجام شده است. روز ۶۰ آبستنی بیانگر مرحله آغازین رشد، روز ۱۲۰ بیانگر مرحله نمو و نمونه های جنین متولد شده بیانگر مرحله بلوغ فولیکول های اولیه مو بودند (۸).

بررسی کیفیت خوانش ها

برای بررسی کیفیت خوانش‌ها از نسخه 11.7 نرم افزار FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) استفاده شد. به کمک این نرم‌افزار کیفیت بازها و خوانش‌ها، میزان آلودگی به آداپتور و غیره بررسی شد. داده های با کیفیت پایین با نسخه 0.39 نرم افزار Trimmomatic (۶) مورد ویرایش قرار گرفتند و مجدد خوانش‌های ویرایش شده برای تعیین کیفیت با نرم افزار FastQC بررسی شدند.

واکاوی تفاوت بیان ژن ها

پس از حذف خوانش‌های کم کیفیت و اطمینان از کیفیت خوانش‌ها عمل هم‌ردیفی[1] بر روی ژنوم مرجع بز (GCA_001704415.1)، دانلود شده از سایت ensemble با استفاده از نرم افزار Hisat2 نسخه 2.1.0 (۱۳) انجام شد. سپس از اندازه گیری میزان بیان ژن ها با استفاده از نسخه 10.0 نرم‌افزار(۱) Htseq2، تغییرات بیان ژن‌ها بین گروه های مورد مطالعه (روز ۶۰ آبستنی، روز ۱۲۰ آبستنی و دو ساعت بعد از تولد) با استفاده از نسخه 1.24 بسته Deseq2 موجود در نرم افزار R (۱۸) مشخص شدند. در این مرحله ژن‌ها در دو دسته قرار گرفتند: ۱- ژنهایی که بیان آنها در تمام طول روند رشد و نمو جنین افزایش یافت ۲- ژنهایی که بیان آنها در تمام طول روند رشد و نمو جنین کاهش یافت.

ساخت شبکه ژنی

در این مرحله شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین در ژن‌های کاهش بیان یافته و افزایش بیان یافته با استفاده از پایگاه اطلاعاتی STRING (نسخه 11.0) به آدرس اینترنتی https://string-db.org جستجو شد و شبکه‌های استخراجی با استفاده از نرم افزار Cytoscape نسخه 3.6.0 (۲۵) ترسیم شدند.

هستی شناسی ژنهای تنظیم کننده

پس از شناسایی و مشخص شدن ژن‌هایی با بیشترین نقش تنظیم کنندگی در شبکه بررسی اطلاعات بیولوژیکی و آنالیز عملکردی ژن‌های مرتبط با رشد و نمو فولیکول با استفاده از پایگاه

1- Alignment

داده‌ای DAVID (نسخه 6.8) انجام شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه جهت بررسی مهمترین مولکول‌های کنترل کننده رشد و نمو فولیکول‌های الیاف در بز کرکی از داده‌های بیان ژن در سه مرحله رشد (روز ۶۰ آبستنی، روز ۱۲۰ آبستنی و دو ساعت بعد از تولد) استفاده شد. بعد از دانلود داده‌ها و ویرایش فایل داده، همردیفی آنها با ژنوم مرجع بز انجام گردید. نتایج حاصل از مراحل ویرایش فایل داده‌ها و همردیف کردن آنها با ژنوم مرجع بز در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۱- خلاصه آنالیز آماری داده های حاصل از توالی یابی نسل آینده

Table1- Summary of statistical analysis from high throughput next generation sequencing

شماره دسترسی فایل داده Accession number	تعداد خوانش قبل از ویرایش کیفیت خوانش ها Row read	تعداد خوانش بعد از ویرایش کیفیت خوانش ها Clean read	درصد خوانش نقشه یابی شده Mapping reads (%)
SRR2102018(E60-1)	10673004	9973683	94.73
SRR2102019(E60-2)	15915915	14855466	93.93
SRR2102020(E60-3)	12364725	11522771	94.53
SRR2102015(E120-1)	10700614	9891507	94.60
SRR2102016(E120-2)	12341735	11454000	93.57
SRR2102017(E120-3)	11613045	10731568	94.87
SRR2102021(NB-1)	10705689	9953187	93.59
SRR2102022(NB-2)	10527961	9832093	93.77
SRR2102023(NB-3)	15768217	14642573	93.79

E60- روز ۶۰ آبستنی با سه تکرار ، E120- روز ۱۲۰ آبسستنی با سه تکرار و NB – دو ساعت بعد از تولد با سه تکرار

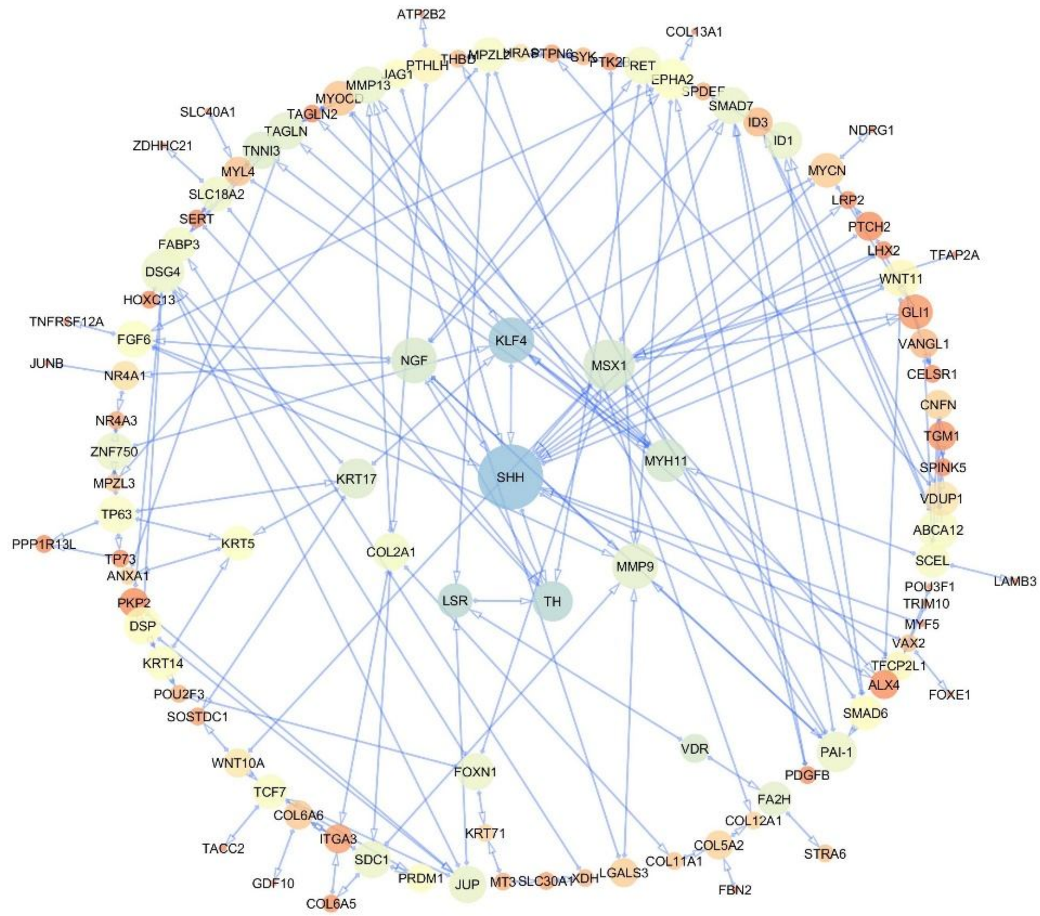
بعد از تعیین سطح بیان هر ژن و میزان سطح تغییرات بیان هر ژن در مقایسات مراحل مختلف رشد (مقایسه دو ساعت بعد از تولد با ۶۰ روز آبستنی، مقایسه بعد از تولد با ۱۲۰روز آبستنی و مقایسه روز۱۲۰ آبستنی با روز۶۰ آبستنی)، ژن‌هایی که در تمام مقایسات بیان آنها افزایش داشته به عنوان ژن‌هایی منظور شدند که با افزایش بیان خود، رشد و نمو فولیکول الیاف را کنترل می‌کنند. از طرفی آن دسته از ژن‌هایی که در تمام مقایسات مراحل رشد فولیکول بیانشان کاهش یافت، به عنوان ژن‌هایی منظور گردیدند که با کاهش بیان خود زمینه رشد و نمو فولیکول کرک را فراهم می‌کنند. در پایان این مرحله ۱۴۵ ژن در دسته ژن‌های افزایش بیان یافته و ۶۵۰ ژن در گروه ژن‌های کاهش بیان یافته قرار گرفتند.

روابط برهمکنش پروتئینی بین ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته به طور مجزا توسط STRING بررسی شد. در بین ژن‌های افزایش بیان یافته روابط بین ۱۴۵ ژن با ۲۰۳ کمان مورد تایید قرار گرفت (p-value<1.0 e -16). مجسم‌سازی این شبکه توسط نرم‌افزار Cytoscape انجام شد (تصویر ۱).

همانطور که در تصویر ۱ آمده است ژن‌های SHH[1]، KLF4[2]، MMP9[3]، MSX1[4] ، KRT17[5] و COL2A1[6] بیشترین تاثیر را بر بیان سایر ژن‌ها داشتند. این ژنها در پژوهش حاضر و سایر پژوهش های گزارش شده الگوی بیان مشابهی داشتند. بنابراین می توانند به عنوان نشانگر زیستی در القا فولیکول مو، پشم و پر به صورت محافظت شده باشند که مختصراً مورد بحث قرار گرفته‌اند.

ژن SHH، ژنی است که بر اساس برازش شبکه برهمکنش پروتئینی بالاترین درجه در شبکه و بیشترین نقش تنظیم کنندگی را نسبت به سایر ژن‌های تشکیل دهنده شبکه دارد و می‌تواند نقش مهم و مؤثرتری را در تکامل و نمو فولیکول الیاف کرک بازی کند. این ژن میتوژن و محرک تکثیر سلولی در بسیاری از بافت ها در دوران جنینی تا بلوغ است و در دوران بلوغ در روند رشد مو نقش دارد (۱۲). همچنین گزارش شده بیان ژن نام برده شده توسط سنتز ژن های Wnt و LEF1 کنترل می‌شود. سنتز E-Cathedrin با LEF1 نیز بیان ژن SHH را افزایش می‌دهد(۲۸). ژن SHH ژنی است که تقریبا همه مسیرهای مرتبط با مورفوژنز مو را کنترل می‌کند و به جوانه های مو کمک می‌کند تا در مرحله ارگانوژنز ایجاد شوند (۲۴). در مطالعه‌ای بیان شده است این ژن به همراه ژن Cyclin-D موجب کاهش رشد سلولهای اپیتلیال پوست به منظور شکل گیری مو بالغ قبل از تولد می‌شود و همچنین به همراه ژن Noggin سبب شروع بلوغ پاپیلا درمال جهت ساخت تارهای مو می‌شود (۳۰).

1- Sonic hedgehog
2- Kruppel-like factor 4
3- Matrix metallopeptidase 9
4- Homeobox protein 1
5- Keratin 17
6- Collagen type II alpha I chain



شکل ۱– شبکه برهمکنش پروتئینی در ژن‌های افزایش بیان داشته در روند رشد و نمو کرک. افزایش میزان مرکزیت میانی که با افزایش شدت رنگ از قرمز به آبی ( ) نشان داده شده است و اندازه بزرگتر گره¬ها نشان دهنده تنظیم کنندگی بیشتر آن¬ها می‌باشد.

Figure 1- The protein-protein interactions network has shown the up-regulated genes in the growth and development process. Increasing the amount of betweennes centrality shown by increasing the intensity of the color from red to blue ( ) and the larger size of the nodes indicate which is the most regulated.

ژن KLF4 نیز ژن دیگری است که بیان آن در تمامی مراحل رشد و نمو فولیکول الیاف در بز کرکی افزایش یافت، این ژن یک عامل رونویسی دخیل در پر توانی سلول های بنیادی جنینی است و به همراه فاکتورهای رونویسی c-myc، oct4 و Sox2 بیان چندین هزار ژن را کنترل می‌کند (۷). ژن KLF4 به عنوان عضوی از خانواده فاکتورهای رونویسی Kruppel، در دستگاه گوارش و دیگر بافت های اپیتلیال از جمله پوست بیان می‌شود(۱۴). در پژوهشی دیگر با هدف بررسی رشد سلول‌های بنیادی اپیتلیال پوست در موش هایی با ژن KLF4 نابود شده، گزارش شد در مقایسه با گروه کنترل، سلول های اپیتلیال موش های فاقد ژن KLF4 در تعداد سلولهای بنیادی مو و توانایی تشکیل کلنی کاهش داشتند و کمبود این ژن در سلولهای بنیادی سبب تاخیر در التیام زخم شد اما بیان این ژن با توجه به خاصیت پرتوانی سلول های بنیادی سبب مهاجرت سلولها به محل زخم شده و تسریع بهبود پوست آسیب دیده می‌شود (۱۴). از اینرو، این پژهشگران پیشنهاد دادند که بیان ژن KLF4 برای نگهداری سلولهای فولیکول مو ضروری است (۱۴). همچنین آنالیز داده های ترانسکریپتوم نشان داده است که بسیاری از ژن های خانواده کراتین بر روی القاء KLF4 تنظیم شده اند. به نظر می رسد که مشارکت مثبت ژن KLF4 در فرآیند توسعه پوست به واسطه افزایش در بیان ژن های خانواده کراتین صورت می پذیرد. علاوه بر این، گزارش شده است که KLF4 پروموتورهای ژن های اپیتلیال از جمله ژن CYP1A1 را فعال می‌کند (۱۰).

ژن MMP9 از دیگر ژن های کلیدی در پژوهش حاضر است که می تواند یکی از مولکول‌های کنترل کننده رشد و نمو فولیکول‌های

الیاف در بـز کرکـی باشـد. همچنـین، برخـی مطالعـات نقـش ژن MMP9 را در بازسازی ماتریکس خارج سلولی در طی توسعه پوسـت و شکل گیری تارهای مو نشان داده اند (۲۰). محل این بیـان ژن در قسمت مرکزی کانال مو که حاوی سلول های هسـته ای کراتینیـزه شده است که بعدها پوست را تشکیل می دهند و لومن اولیه تارهـای مو را ایجاد می کنند. بنابراین کانال مو برای ظهور ساقه مو آماده می کند و دیواره های آن را از آسیب القاء شده توسط فیبر مو در حال رشد محافظت می کند (۲۶).

یکی دیگر از ژن های مطرح در شـبکه ژنMSX1 مـی باشـد و نقش این ژن به عنوان تنظیم کننـده اصـلی در فرآینـد رشـد و نمـو فولیکول مو در انسان، موش و بز کشمیر به اثبات رسیده است (۲۶). همچنین، در انسان ژن MSX1 در اپیدرم و فولیکول مـو بیـان مـی شود و افزایش بیانش سبب سرکوب ژن های موثر در طاسی می شود (۲۹). در پژوهشی دیگر بیان شده، افزایش بیان ایـن ژن بـه منظـور ریخت زایی بسیاری از بافت های جنینی از جمله فولیکول مو، جوانه دندان و دم جنین نیاز است (۵). بنابراین با توجه به نتایج این پژوهش و نتایج گزارش شده در پژوهش‌های دیگر با احتمال زیاد ساز و کـار مولکولی پایه برای این ژن بین گونه های مختلف بصورت حفظ شده است و این ژن نقش موثری در فرآیند رشد و نمو فولیکول الیاف بـز کرکی دارد.

برازش شبکه ژنی در این مطالعه نشـان داد دو عضـو از خـانواده ژنی KRT (KRT17 و KRT5) نقش مهمی در تکامل فولیکول‌های الیاف در بز کرکی دارند. خانواده ژنی KRT کد کننده پروتئین هایی با درصد گلایسین و تیروزین بالا هستند و به عنوان اصلی ترین پروتئین های ساختاری الیاف مو همراه با خانواده ژنی KAP می باشند (۳۰). ژن های خانواده KRT در ساختمان فولیکـول هـای اولیـه و ثانویـه حضور دارند و معروف به کراتین مو هستند و در بسیاری پژوهش هـا برای ارزیابی کیفیت کشمیر و پشم به عنوان نشانگر تعیین کیفیت مو سطح بیانشان انـدازه گیـری شـده اسـت (۳۰). در مطالعـه ای از ژن هـــــــــــــــــای KRT31، KRT32، KRT33A، KRT34، KRT35، KRT36، KRT37، KRT38، KRT39 و KRT40 بـــه عنوان نشانگرهای ژنی تعیین کیفیت الیاف مو بز یاد شـده اسـت. در مطالعه ای دیگر گزارش شده است که KRT17 و KRT5 همـراه بـا ژن های KRT14، KRT25، KRT27، KAP13.1 و KAP9.2 در توسعه فولیکول مو موثرند و الگوی بیان متفاوتی در طول دوره رشـد مو بز دارند (۱۶). همچنین بیان شده است که یکی از وظایف برجسته ژن KRT17 شرکت در مورفوژنز مو است و این ژن در الیاف مو نیـز حضور دارد (۲۴). در این پژوهش با توجه به اینکه معیارهای شبکه‌ای ژن KRT5 کم بودند، اما با توجه به نقش حائز اهمیت آن در فرآیند مرتبط با رشد و نمو فولیکول مو و افزایش بیان آن در مراحـل رشـد تارهای مو می تواند بعنوان نشانگر زیستی نقش مهمی در اصلاح نژاد صفت اقتصادی تولید کرک ایفا کند.

ژن COL2A1 یکی دیگر از ژن هایی که در برازش شبکه ژنـی از مقادیر بالای پارامترهای مرکزیت برخوردار بود. مشـاهده افـزایش بیان این ژن فقط در مرحله روز ۶۰ تا روز۱۲۰ جنینی ، به این معنـی است که ژن COL2A1 احتمالاً به نمو فولیکول اولیه مو کمک مـی کند که با یافته های پژوهشگران دیگر هماهنگ می باشد (۱۹). این پژوهشگران بیان کردند که ژن COL2A1 همراه با تعامل شبکه ای کـــه بـــا رونوشـــت هـــای SHH، KRT15، KRT4، KRT1، و COL17A1 دارد در توسعه تراکم پوست و نمو فولیکول هـای پشـم گوسفند نقش مهمی دارد. در پژوهشی دیگر با اسـتفاده از داده هـای ترانسکریپتوم پوست مرغ، گزارش گردیـد کـه بیـان ژن COL2A1 همراه با سایر ژن های خانواده کلاژن فقط در دوره جنینی از روز ۶ تا ۸ افزایش یافته و بعد از آن سطح بیانشـان تفـاوت معنـی دار نـدارد. بنابراین خانواده ژن های کلاژن با توجه به نداشـتن تغییـرات بیـانی ممتد در دوره جنینی فقط در مرحله مورفوژن فولیکول پر نقش دارند (۱۱).

شبکه برهمکنش بین ژن‌های کاهش بیان یافتـه نیـز ارتباطـات هم‌بیـانی بـین ۶۵۰ ژن بـا کمـک ۱۳۰۲ کمـان را تاییـد کـرد (p-value<1.74 e -5). مجسم‌سازی این شبکه در تصویر ۲ نمایش داده شده است.

در میان ژن‌های کاهش بیان داشته نیز، ژن VEGFA [1] اهمیت بیولوژیکی بیشتری را از خود نشان داد. این ژن یک کلیگـو پـروتئین ۴۵ کیلو دالتونی است که به عنوان عضوی از خانواده فاکتورهای رشد پپتیدی در سلول های فولیکول مو در مرحله آناژن در اکثر پستانداران بیان می شود (۳۳). ژن VEGFA یکی از مهم ترین فاکتورهای رگ زایی است که به کمک دو رسپتور ویـژه VEGFR1 و VEGFR2 ، که فقط در سلولهای اندوتلیالی بیان می شوند، مهاجرت سلول هـای اندوتلیالی و نیز تکثیر و نفوذ پذیری آن ها را تنظیم می کند (۲۱). این ژن همچنین یک فاکتور ضد مـرگ برنامـه ریـزی شـده سـلولی در سلولهای اندوتلیالی نیز محسوب می شود. از آنجائیکه بازآرایی بافـت به خصوص در هنگام نمو و تشکیل فولیکول اولیه مو نیـاز بـه منبـع خون مناسب دارد و تشکیل رگ های خونی پیش ساز اولیه باز آرایی می باشد (۲۱). در مطالعه ای گزارش شده که گیرنـده VEGFR1 از این ژن در هنگام بازسازی فولیکول های موی بز کشمیری نقش دارد (۱۵). از اینرو این ژن می تواند نقش تنظیم کنندگی در مراحل تکامل و رشد فولیکول الیاف بز کرکی داشته باشد.

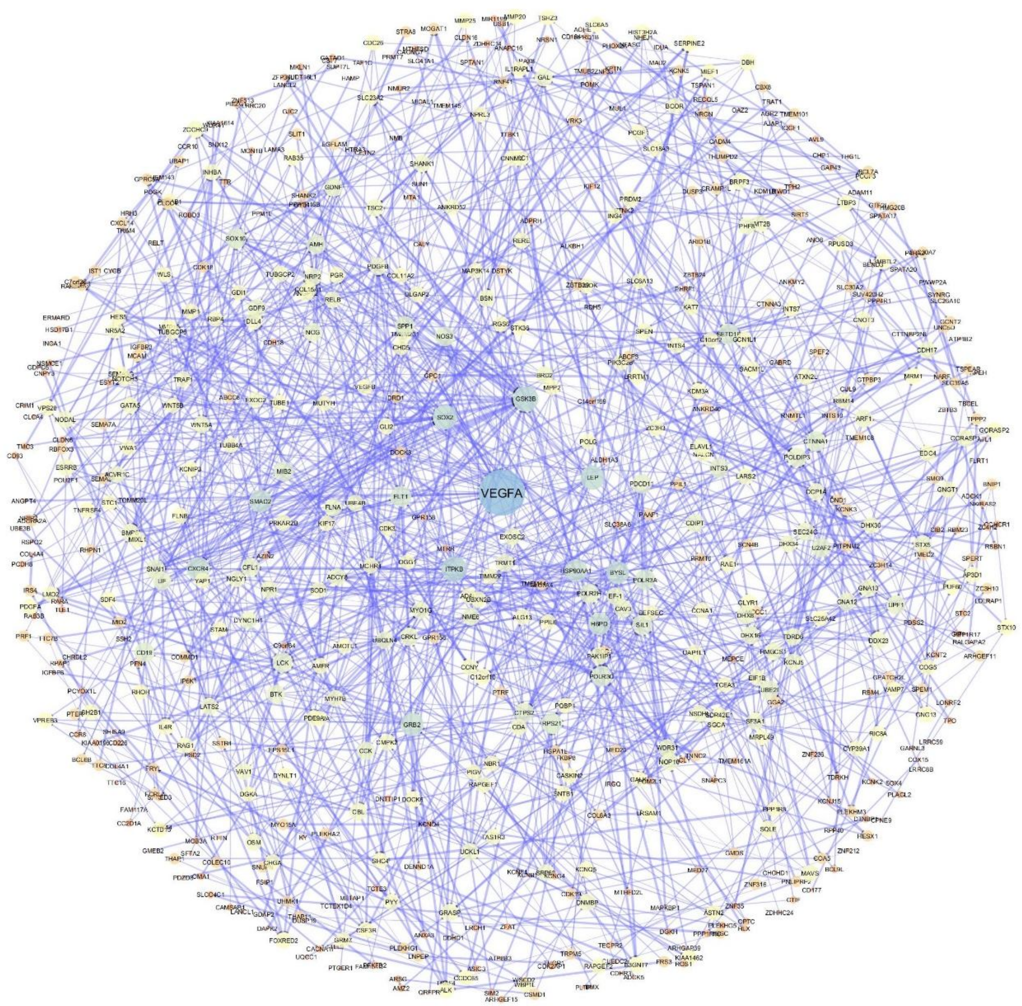
در این مطالعه پس از بررسی روابـط بـرهمکنش پروتئینـی بـین

1- Vascular Endothelial Growth Factor

ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته، ژن‌های تنظیم کننـده در رونـد تکامل فولیکول‌های الیاف در بـز کرکـی از دوران جنینـی تـا تولـد، براساس نتایج واکاوی آماری مشخص شدند و براساس مستندسـازی عملکردی نقش کلیدی این ژن‌ها بر روند تکامل فولیکول‌های الیـاف در بز کرکی از دوران جنینی تایید شد و نتایج مستندسازی در جدول ۲ مشخص شده است.

نتیجه گیری کلی

در پژوهش حاضر، باز سازی شبکه هم بیانی ژن ها با استفاده از ژن‌های مؤثر بر روند تکامل فولیکول‌های الیاف در بز کرکی از دوران جنینی تا تولد، منجر به شناسایی ۱۴۵ ژن در دسته ژن‌های افـزایش بیان یافته و ۶۵۰ ژن در گروه ژن‌های کاهش بیان یافته شد، با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل عملکردی ژن‌ها انتظـار مـی رود ژن هـای کلیدی دخیل در رشد و نمو فولیکول الیاف، ژن‌هـای KLF4، SHH، MMP9، MSX1، KRT17، COL2A1 و VEGFA باشـــند کـــه دارای بیشترین اهمیت از نظر میزان تأثیرگذاری بر بیان سـایر ژن‌هـا بودند و این ژن ها در مسیرهای مرتبط با مورفوژنز و ساخت تارهای مو، بازسازی فولیکول های مو، بهبود کیفیت مـو و توسـعه و تـراکم پوست تاثیر گذار بودند. با توجه به نقش حـائز اهمیـت ایـن ژنهـا در فرآیند های مرتبط با رشد و نمو فولیکول مو می توانند بعنوان نشانگر زیستی در اصلاح نژاد صفات اقتصادی مربـوط بـه بهبـود کمیـت و کیفیت کرک مورد بهره برداری قرار گیرند.



شکل ۲- شبکه برهمکنش پروتئینی در ژن‌های کاهش بیان داشته در روند رشد و نمو کرک. افزایش میزان مرکزیت میانی که با افزایش شدت رنگ از قرمز به آبی ( ) نشان داده شده است و اندازه بزرگتر گره¬ها نشان دهنده تنظیم کنندگی بیشتر آن¬ها می‌باشد.

Figure 2- The protein-protein interactions network has shown the down-regulated genes in the growth and development process.

Increasing the amount of betweennes centrality shown by increasing the intensity of the color from red to blue ( )
and the larger size of the nodes indicate which is the most regulated.

جدول۲- ژن‌های مؤثر بر روند تکامل فولیکول‌های الیاف در بز کرکی از دوران جنینی تا تولد

Table 2- Effective gene related to development stage of hair follicle in cashmere goat from fetal to birth

نام ژن Gene Name	میانگین میزان بیان در سه مرحله Gene Expression Average in 3 Stage	عبارات بیولوژیکی GO Terms
SHH	4.3	hair follicle development (GO:0001942)
KLF4	1.8	epidermal cell differentiation(GO:0009913)
MSX1	4.7	tissue development(GO:0009888)
MMP9	4.9	system development(GO:0048731)
KRT17	3.1	epidermis development(GO:0008544)
COL2A1	2.05	Collagen trimer(GO:0005581)
VEGFA	-3.4	Growth factor activity(GO:0008083)

منابع

1- Anders, S., P. T. Pyl, and W. Huber. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics (Oxford, England), 31 (2): 166–169.

2- Ansari-renani, H. R., Z. Ebadi, S. Moradi, H. R. Baghershah, M. Y. Ansari-renani, and S. H. Ameli. 2011. Determination of hair follicle characteristics , density and activity of Iranian cashmere goat breeds. Small Ruminant Research, 95 (2–3): 128–132.

3- Ayaz, A., Z. Iqbal, B. Ahmad, N. A. Ganai, N. Singh, A. Ali, T. Mumtaz, M. A. Dar, M. Shabir, and S. Shanaz. 2017. Impact of high glycine tyrosine KAP genes on Cashmere fibre trait characteristics. Biotechnology Journal International, 19 (3): 1–5.

4- Barazandeh, A., S. M. Moghbeli, N. G. Hossein-Zadeh, and M. Vatankhah. 2012. Genetic evaluation of growth in Raini goat using random regression models. Livestock Science, 145 (1–3): 1–6.

5- Blin-Wakkach, C., F. Lezot, S. Ghoul-Mazgar, D. Hotton, S. Monteiro, C. Teillaud, L. Pibouin, S. Orestes-Cardoso, P. Papagerakis, and M. Macdougall. 2001. Endogenous Msx1 antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98 (13): 7336–7341.

6- Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics (Oxford, England), 30 (15): 2114–2120.

7- Dosch, R. 2015. Next generation mothers: maternal control of germline development in zebrafish. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 50 (1): 54–68.

8- Gao, Y., X. Wang, H. Yan, J. Zeng, S. Ma, Y. Niu, G. Zhou, Y. Jiang, and Y. Chen. 2016. Comparative transcriptome analysis of fetal skin reveals key genes related to hair follicle morphogenesis in cashmere goats. PLoS ONE, 11 (3): 1–20.

9- Geng, R., C. Yuan, and Y. Chen. 2013. Exploring differentially expressed genes by RNA-Seq in cashmere goat (Capra hircus) skin during hair follicle development and cycling. PloS One, 8 (4): e62704.

10- Georgantas, R. W., V. Tanadve, M. Malehorn, S. Heimfeld, C. Chen, L. Carr, F. Martinez-Murillo, G. Riggins, J. Kowalski, and C. I. Civin. 2004. Microarray and serial analysis of gene expression analyses identify known and novel transcripts overexpressed in hematopoietic stem cells. Cancer Research, 64 (13): 4434–4441.

11- Gong, H., H. Wang, Y. Wang, X. Bai, B. Liu, J. He, J. Wu, W. Qi, and W. Zhang. 2018. Skin transcriptome reveals the dynamic changes in the Wnt pathway during integument morphogenesis of chick embryos. PloS One, 13 (1): e0190933.

12- Jiang, J., and C. Hui. 2008. Hedgehog signaling in development and cancer. Developmental Cell, 15 (6): 801–812.

13- Kim, D., B. Langmead, and S. L. Salzberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nature Methods, 12 (4): 357–360.

14- Li, J., H. Zheng, J. Wang, F. Yu, R. J. Morris, T. C. Wang, S. Huang, and W. Ai. 2012. Expression of Kruppel-like factor KLF4 in mouse hair follicle stem cells contributes to cutaneous wound healing. PLoS ONE, 7 (6): e39663–e39663.

15- Liu, B., F. Gao, J. Guo, D. Wu, B. Hao, Y. Li, and C. Zhao. 2016. A microarray-based analysis reveals that a short

photoperiod promotes hair growth in the Arbas Cashmere goat. PloS One, 11 (1): e0147124–e0147124.

16- Liu, G., R. Liu, X. Tang, J. Cao, S. Zhao, and M. Yu. 2015. Expression profiling reveals genes involved in the regulation of wool follicle bulb regression and regeneration in sheep. International Journal of Molecular Sciences, 16 (5): 9152–9166.

17- Liu, H., C.-W. Yue, W. Zhang, X. Zhu, G. Yang, and Z. Jia. 2011. Association of the KAP 8.1 gene polymorphisms with fibre traits in inner mongolian cashmere goats. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 24 (10): 1341–1347.

18- Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology, 15 (12): 550.

19- Nie, Y., S. Li, X. Zheng, W. Chen, X. Li, Z. Liu, Y. Hu, H. Qiao, Q. Qi, and Q. Pei. 2018. Transcriptome reveals long non-coding RNAs and mRNAs involved in primary wool follicle induction in carpet sheep fetal skin. Frontiers in Physiology, 9 446.

20- Nothnick, W. B. 2008. Regulation of uterine matrix metalloproteinase-9 and the role of microRNAs. Seminars in Reproductive Medicine, 26 (6): 494–499.

21- Ozeki, M., and Y. Tabata. 2003. In vivo promoted growth of mice hair follicles by the controlled release of growth factors. Biomaterials, 24 (13): 2387–2394.

22- Qiao, X., J. H. Wu, R. B. Wu, R. Su, C. Li, Y. J. Zhang, R. J. Wang, Y. H. Zhao, Y. X. Fan, and W. G. Zhang. 2016. Discovery of differentially expressed genes in cashmere goat (Capra hircus) hair follicles by RNA sequencing. Genetics and Molecular Research, 15 (3): gmr.15038589.

23- Qu, B. O., Y. Qiu, Z. Zhen, and F. Zhao. 2016. Computational identification and characterization of novel microRNA in the mammary gland of dairy goat (Capra hircus). 95 (3): 1–31.

24- Sennett, R., and M. Rendl. 2012. Mesenchymal–epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. Seminars in Cell and Developmental Biology Developmental Biology, 23 (8): 917–927.

25- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Research, 13 (11): 2498–2504.

26- Sharov, A. A., M. Schroeder, T. Y. Sharova, A. N. Mardaryev, E. M. J. Peters, D. J. Tobin, and V. A. Botchkarev. 2011. Matrix metalloproteinase-9 is involved in regulation of the hair canal formation. The Journal of Investigative Dermatology, 131 (1): 257.

27- Song, S., M. Yang, Y. Li, M. Rouzi, Q. Zhao, Y. Pu, X. He, J. M. Mwacharo, N. Yang, Y. Ma, and L. Jiang. 2018. Genome-wide discovery of lincRNAs with spatiotemporal expression patterns in the skin of goat during the cashmere growth cycle. BMC Genomics, 19 (1): 1–12.

28- St-Jacques, B., H. R. Dassule, I. Karavanova, V. A. Botchkarev, J. Li, P. S. Danielian, J. A. McMahon, P. M. Lewis, R. Paus, and A. P. McMahon. 1998. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. Current Biology, 8 (19): 1058–1069.

29- Stelnicki, E. J., M. R. Harrison, D. Holmes, N. S. Adzick, L. G. Kömüves, W. Clavin, and C. Largman. 1997. The human homeobox genes MSX-1, MSX-2, and MOX-1 are differentially expressed in the dermis and epidermis in fetal and adult skin. Differentiation, 62 (1): 33–41.

30- Temizkan, M. C., and A. G. Bayraktaroglu. 2017. Effective Gene on Hair Follicle Growth. Mae Vet Fak Derg, 2 (1): 61–73.

31- Wang, L., Y. Zhang, M. Zhao, R. Wang, R. Su, and J. Li. 2015. SNP discovery from transcriptome of cashmere goat skin. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 28 (9): 1235.

32- Yang, M., S. Song, K. Dong, X. Chen, X. Liu, M. Rouzi, Q. Zhao, X. He, Y. Pu, W. Guan, Y. Ma, and L. Jiang. 2017. Skin transcriptome reveals the intrinsic molecular mechanisms underlying hair follicle cycling in Cashmere goats under natural and shortened photoperiod conditions. Scientific Reports, 7 (1): 1–12.

33- Yano, K., L. F. Brown, and M. Detmar. 2001. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. The Journal of Clinical Investigation, 107 (4): 409–417.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 2, Summer 2020, p. 231-240

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۲۴۰-۲۳۱

Reconstruction of genes co-expression network related to the growth and development of fiber follicle in Cashmere goat fetus

A. Barazandeh[1], M. Mokhtari[1], E. Behdani[2], Z. Roudbari[1*]
Submitted: 04-07-2019
Accepted: 11-09-2019

Introduction In most mammals, each hair follicle is a mammalian skin organ that produces hair and controls the hair growth cycle. The hair follicle is central to most economically important fiber growth in livestock. Previous studies have shown that changes in the level of genes expression play a role in the development and growth of hair follicles. With the advent of high throughput, next-generation sequencing technology measuring the level of expression of thousands of genes was possible simultaneously. As a result, many regulatory conflicts between genes can be extracted from these data. Expression profiles are generated by combining expression levels resulting from experiments in various conditions or times. Similarities and differences between expression profiles reveal many of these regulatory relationships. Despite recent advances in the identification of the molecular signaling/co-expression networks that govern the development of the skin and hair follicle, the mechanisms controlling of fiber production in Cashmere goat still remains unclear. Therefore, the present study was conducted to investigate the most important molecules controlling the growth and development of hair follicles in cashmere goats in order to decode the genes involved in the growth and development of hair follicles in cashmere goats.

Materials and Methods Publicly available preprocessed transcript data (accession no. SRP059481) was downloaded from the NCBI database in the SRA section. In this investigation, nine goats were selected at the same stage of gestation. Three fetuses were obtained at 55-65 days' gestation (60-days old) and three fetuses were obtained at 105-125 days' gestation (120 –day- old) through cesarean operation and three fetuses were also sacrificed within two hours of birth (newborn). For analysis of RNA-seq data, a random sampling from the right mid-side of the fetal skin and each time point had three replicates. The 60 days (E60) of gestation represented the initiation stage of growth, and the 120 d (E120) represented the development stage, as well as the newborn samples, represented the primary hair follicle maturation stage. The FastQC software (Version 11.7) was used to check the quality of the readings. This software check the quality of the reads, in case of low-quality sequencing, the data were edited by Trimmomatic software (Version 0.39), and filtered reads were evaluated with FastQC software, After removing low-quality reads mapping was performed on the goat reference genome (GCA_001704415.1) downloaded from the ensemble site using the Hisat2 software(Version 2.1.0). The HTSeq2 (Version 10.0) was used to create the count matrix, changes in the expression of genes between the groups (E60, E120, and newborns) was identified using the software Deseq2 (Version 1.24). In this stage, the genes between the two groups were compared to give an expression difference 1- Genes that are expressed throughout the growth process of the follicle 2. Co-Expression networks of up and down genes were created using the STRING database (Version 11) at https://string-db.org. The PPI network was constructed by Cytoscape software (Version 3.6.0). Cytoscape is commonly used for analysis and visualization of biological networks. Gene ontology analysis of effective gene related to development stage of hair follicle in Cashmere goat from fetal to birth was done using DAVID database.

Results and Discussion After determining the level of expression of each gene at different stages of sampling, genes that increased expression in all comparisons were considered as up-regulated genes that, by increasing their expression, control the growth and development of hair follicle. On the other hand, those genes that have been shown to reduce expression in all of the follicle growth stages comparisons were considered as genes which by decreasing their

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran,
2- PhD Graduated, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources of Ramin University, Khozestan, Iran.
(*- Corresponding Author Email: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v12i2.81710

expression, causes the growth and development of the hair follicle. The interaction relations were investigated between the increased and reduced genes expressed separately by STRING database. Among the up-regulated genes, the relationships between 145 genes with 203 edge were confirmed. Also, the interaction network between the down-regulated genes confirmed between 650 genes with 1302 edge. Among the genes with differential expression, the co-expression genes (genes with the most interacting) were identified based on the results of the analysis of the statistical parameters of the network using computational algorithms in Cytoscape software. These results led to the identification of seven unique genes that were SHH, KLF4, MMP9, MSX1, KRT17, COL2A1 and VEGFA, ontology analysis of these genes showed that involved the hair cycle process, hair follicle development, skin epidermis development, epidermis morphogenesis and epidermal cell differentiation that these pathways are activated in the cashmere production process. Therefore, these genes have been used as regulators of cashmere growth and development to better understand the cashmere production process and improve its quality.

Conclusion The results have been able to introduce genes with major effects that regulate the expression of genes and molecular signals associated with the production of fiber that including KLF4, MMP9, MSX1, KRT17, COL2A1 and VEGFA in Cashmere goats. Based on functional analysis, these genes can play a significant role in the improvement of cashmere goats breeding. We hope that the obtained results would be beneficial toward finding the smart strategies for Cashmere production improvement.

Keyword: Cashmere goat, Differential expression, Regulatory network, Transcriptome analysis.